

(Translation)

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application: April 11, 2000

Application Number: Japanese Patent Application
No. 2000-109954

Applicant(s): RIKEN
Katsuhiko MIKOSHIBA

March 9, 2001

Commissioner,
Patent Office

Kozo OIKAWA (seal)

Certificate No. 2001-3018180

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application: 2000年 4月 11日

出願番号

Application Number: 特願2000-109954

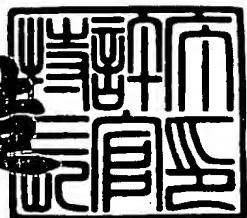
出願人

Applicant(s): 理化学研究所
御子柴 克彦

2001年 3月 9日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3018180

【書類名】 特許願

【整理番号】 RJH11-060N

【提出日】 平成12年 4月11日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 14/00

【発明の名称】 トランケート型リーリンタンパク質およびそれをコードするDNA

【請求項の数】 10

【発明者】

【住所又は居所】 東京都三鷹市井の頭2-19-25

【氏名】 御子柴 克彦

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市花見川区幕張町4-544-14 幕張四
丁目団地3-405

【氏名】 田畠 秀典

【発明者】

【住所又は居所】 東京都板橋区前野町6-24-2-205

【氏名】 仲嶋 一範

【特許出願人】

【識別番号】 000006792

【氏名又は名称】 理化学研究所

【特許出願人】

【識別番号】 392017978

【氏名又は名称】 御子柴 克彦

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【選任した代理人】

【識別番号】 100098121

【弁理士】

【氏名又は名称】 間山 世津子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9503608

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 トランケート型リーリンタンパク質およびそれをコードするDNA

【特許請求の範囲】

【請求項1】 リーリンタンパク質のF-spondinドメインおよびCR-50認識部位を含むが、リピート部位を含まないトランケート型リーリンタンパク質。

【請求項2】 アフリカツメガエルまたはマウスに由来する請求項1記載のトランケート型リーリンタンパク質。

【請求項3】 以下の(a)または(b)のいずれかである請求項2記載のトランケート型リーリンタンパク質。

(a)配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号2のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつリーリンタンパク質の活性を有するタンパク質

【請求項4】 以下の(a)または(b)のいずれかである請求項2記載のトランケート型リーリンタンパク質。

(a)配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号4のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつリーリンタンパク質の活性を有するタンパク質

【請求項5】 リーリンタンパク質のF-spondinドメインおよびCR-50認識部位を含むが、リピート部位を含まないトランケート型リーリンタンパク質をコードするDNA。

【請求項6】 アフリカツメガエルまたはマウスに由来する請求項5記載のDNA。

【請求項7】 以下の(a)または(b)のいずれかであるトランケート型リーリンタンパク質をコードする請求項6記載のDNA。

(a)配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号2のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換

若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつリーリンタンパク質の活性を有するタンパク質

【請求項8】 以下の(a)～(c)のいずれかである請求項7記載のDNA。

(a)配列番号1の塩基配列を有するDNA

(b)配列番号1の塩基配列の1456番～2273番の塩基の配列を有する核酸プローブとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつリーリンタンパク質の活性を有するタンパク質をコードするDNA

(c)(a)または(b)のDNAの塩基配列と縮重関係にある塩基配列を有するDNA

【請求項9】 以下の(a)または(b)のいずれかであるトランケート型リーリンタンパク質をコードする請求項6記載のDNA。

(a)配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号4のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつリーリンタンパク質の活性を有するタンパク質

【請求項10】 以下の(a)～(c)のいずれかである請求項9記載のDNA。

(a)配列番号3の塩基配列を有するDNA

(b)配列番号3の塩基配列の2053番～2758番の塩基の配列を有する核酸プローブとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつリーリンタンパク質の活性を有するタンパク質をコードするDNA

(c)(a)または(b)のDNAの塩基配列と縮重関係にある塩基配列を有するDNA

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、リーリンタンパク質のトランケート型アイソフォームおよびそれをコードするDNAに関する。

【0002】

【従来の技術】

中枢神経系の発生過程においては、脳室側で誕生した神経芽細胞はその発生運命に従って定められた場所へ移動し、最終分化を果たす。このとき、どのような

仕組みで神経芽細胞が自分の移動すべき場所を認識しているのかが問題となる。この仕組みを研究する上で非常に有用な突然変異マウスとしてリーラーが古くから知られている。リーラーでは神経芽細胞が正しい場所に移動できず、大脳、小脳、海馬等、中枢神経系のあらゆる場所において神経細胞の位置異常が認められる。リーラーで欠損している分子を同定するため、我々はリーラーに対して正常マウスの胎児脳を免疫し、モノクローナル抗体、CR-50を得た (Neuron 14,899-912(1995))。CR-50抗原は大脳ではCajal Retzius細胞に限局して発現していた。その後、リーラーの原因遺伝子としてreelinがクローニングされた (Nature 374, 719-723(1995), Genomics 26,543-549(1995), Nature Genetics 10,77-82(1995))。ReelinはN末端側にF-spondinとある程度の相同性を示すF-spondinドメインをもち、ヒンジ領域を挟んでC末端側にはReelinタンパク質の大部分を占める8個のReelin repeatをもつ巨大な細胞外タンパク質であった (Nature 374, 719-723(1995))。Reelin repeatの各リピート内にはEGF様モチーフがあり、このことからReelinタンパク質は細胞外基質(ECM)としての性質を持つことが予想されている。CR-50抗原はReelinそのものであり、さらにCR-50はin vitro、in vivoの両方でReelinの機能を阻害できることが明らかとなった (J. Neurosci., 17,23-31(1997), Nature 385,70-74(1997), J. Neurosci., 17,3599-3609(1997), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94,8196-8201(1997))。CR-50の認識部位はF-spondinドメインとReelin repeat Iの間にあることが確定している (J. Neurosci., 17,23-31(1997))。

【0003】

以上のような背景から、ReelinのN末端部は、Reelinの機能と直結する部位であり、一方Reelin repeatはReelinタンパク質をECM様分子としてCajal-Retzius細胞などのReelin産生細胞の近傍に留め、より限局したシグナルを付与するものと考えられた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、大脳では層構造が観察されない両生類におけるReelin (以下、「リーリン」と記す。) タンパク質の存在を確認することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、アフリカツメガエル(*Xenopus*)のリーリン相同分子のクローニングを行い、その過程で選択的スプライシングによって產生されるトランケート型アイソフォームの存在を明らかにした。このアイソフォームはF-spondinドメインとCR-50 認識部位を持つが、*Reelin repeat* (以下、「リピート部位」と記す。) は一つも持たない分子であった。さらに、本発明者らは、このタイプのアイソフォームがマウスにも存在することを明らかにした。これらのアイソフォームはリピート部位を含まないことから、ECM様分子という性質は持たず、むしろより遠くに拡散する液性因子としての役割を持つことが考えられる。本発明は、上記の知見に基づいて完成された。

【0006】

本発明の要旨は以下の通りである。

- (1) リーリンタンパク質のF-spondinドメインおよびCR-50認識部位を含むが、リピート部位を含まないトランケート型リーリンタンパク質。
- (2) アフリカツメガエルまたはマウスに由来する(1)記載のトランケート型リーリンタンパク質。
- (3) 以下の(a)または(b)のいずれかである(2)記載のトランケート型リーリンタンパク質。
 - (a)配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質
 - (b)配列番号2のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつリーリンタンパク質の活性を有するタンパク質

【0007】

- (4) 以下の(a)または(b)のいずれかである(2)記載のトランケート型リーリンタンパク質。
 - (a)配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質
 - (b)配列番号4のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつリーリンタンパク質の活性を有

するタンパク質

【0008】

(5) リーリンタンパク質のF-spondinドメインおよびCR-50認識部位を含むが、リピート部位を含まないトランケート型リーリンタンパク質をコードするDNA。

(6) アフリカツメガエルまたはマウスに由来する(5)記載のDNA。

(7) 以下の(a)または(b)のいずれかであるトランケート型リーリンタンパク質をコードする(6)記載のDNA。

(a)配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号2のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつリーリンタンパク質の活性を有するタンパク質

【0009】

(8) 以下の(a)~(c)のいずれかである(7)記載のDNA。

(a)配列番号1の塩基配列を有するDNA

(b)配列番号1の塩基配列の1456番~2273番の塩基の配列を有する核酸プローブとストリンジエントな条件下で(例えば、5xSSPE、50%ホルムアミド存在下で42℃(但し、20xSSPE=3M NaCl、173mM NaH₂PO₄、25mM EDTA))ハイブリダイズし、かつリーリンタンパク質の活性を有するタンパク質をコードするDNA

(c)(a)または(b)のDNAの塩基配列と縮重関係にある塩基配列を有するDNA

【0010】

(9) 以下の(a)または(b)のいずれかであるトランケート型リーリンタンパク質をコードする(6)記載のDNA。

(a)配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号4のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつリーリンタンパク質の活性を有するタンパク質

【0011】

(10) 以下の(a)~(c)のいずれかである(9)記載のDNA。

- (a)配列番号3の塩基配列を有するDNA
- (b)配列番号3の塩基配列の2053番～2758番の塩基の配列を有する核酸プローブとストリンジエントな条件下で（例えば、5xSSPE、50%ホルムアミド存在下で42℃（但し、20xSSPE=3M NaCl、173 mM NaH₂PO₄、25 mM EDTA））ハイブリダイズし、かつリーリンタンパク質の活性を有するタンパク質をコードするDNA
- (c) (a)または(b)のDNAの塩基配列と縮重関係にある塩基配列を有するDNA

【0012】

本明細書において、「リーリンタンパク質」とは、リーラー突然変異マウスの原因遺伝子で、シグナルペプチド、F-spondinドメイン、CR-50認識部位、リーリンリピートを含む細胞外基質タンパク質をいう。

「F-spondinドメイン」とは、リーリンタンパク質のN末端側において、F-spondinとの間に相同性が認められる領域をいう。

【0013】

「CR-50認識部位」とは、マウスのリーリンタンパク質において、CR-50抗体の認識する部位、または他の生物のもつリーリンタンパク質においては、マウスリーリンのCR-50認識部位と相同な領域をいう。なお、CR-50抗体は、Neuron 14, 899-912(1995)に記載の方法により作製することができる。

「リピート部位」とは、リーリンタンパク質のC末端側において、中心にEGF様モチーフをもつ互いに相同性のあるアミノ酸配列の単位が連続して繰り返される領域をいう。

【0014】

「リーリンタンパク質の活性」には、リーリンタンパク質が有するいがなる生物学的および免疫学的作用も含まれるが、その一例として、神経細胞を正しい位置に配置させる機能を挙げることができる。この機能は、Nature 385, 70-74(1997), J. Neurosci., 17, 3599-3609(1997), Proc. Natul. Acad. Sci. USA, 94, 8196-8201(1997)に記載の方法により確認することができる。

【0015】

【発明の実施の形態】

リーリンは大脳においては正常な層構造を形成する上で不可欠な分子である。

両生類の大脳では層構造は観察されないが、このような動物にもリーリン分子が存在するのかどうかを明らかにするため、アフリカツメガエルリーリンの探索を行った。

【0016】

縮重プライマーによるPCRの結果、アフリカツメガエルリーリン(Xreelin)のPCR断片を得ることができた。驚いたことに、3'-RACEによる解析から、XreelinにはN末端側に位置するF-spondinドメインとヒンジ領域のほとんどの部分を含むが、リピート部位を一つも持たないスプライシング変異体が存在することが明らかとなった。完全型のXreelinおよびトランケート型のXreelinはともに尾芽胚期(st.28)に発現が開始され、その後成体になるまで継続して発現していた。ノーザンプロット解析を行った結果、完全型の転写産物はマウスと同じように約1.2 kbのものであった。トランケート型は、3~4 kbの位置にバンドが確認された。in situ hybridization法により、完全型の転写産物は尾芽胚期の嗅球と視蓋の原基に検出され、オタマジャクシの時期(st.47)になってからは小脳における発現も確認された。これらの結果は概ねマウスと一致するものであった。しかし、大脳における発現は観察されず、このことはXenopusの脳に層構造がないことと対応していた。

【0017】

本発明のトランケート型リーリンタンパク質には、リーリンタンパク質の約85%を占めるReelin repeatが無い。Reelin repeatはEGF様モチーフをもつ配列が8回くり返して現われる領域であり、他のEGF様モチーフをもつ細胞外基質分子との結合が示唆されている。このことから、Reelin repeatはリーリンタンパク質を細胞外基質に留めるために必要な領域であり、このリピート部位の無いトランケート型アイソフォームは生体内でより遠くまで拡散すると考えられる。

【0018】

例えば、本発明のトランケート型リーリンタンパク質をコードするcDNAを発現ベクターに組み込み、これを患者の組織に由来する神経芽細胞、神経幹細胞等に導入し、この細胞を患者の脳に移植することにより、神経細胞の配置異常による滑脳症、多小脳回症、異所性灰白質等の疾患の治療を行うことができる。

【0019】

【実施例】

本発明を以下の実施例により具体的に説明する。これらの実施例は説明のためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例1】アフリカツメガエル・リーリン (Xreelin)のクローニング
方法

35期 (Nieuwkoop, P.D. & Faber, J. (1967) in *Normal Table of Xenopus laevis* (Daudin), (North-Holland Publishing Company, Amsterdam).) アフリカツメガエル全胚から精製した全RNAより、Super Script II (Gibco BRL) を用いてランダムにプライミングしたcDNAを合成し、これを縮重プライマーを用いたPCRにかけた。一対の縮重プライマー (5'-A(A/G)TT(T/C)GGIAA(T/C)CA(A/G)TT(T/C)ATGTG-3' (配列番号5) および5'-TG(T/C)TCICCCAT(T/C)CA(A/G)TT-3' (配列番号6)) を用いて、図1に示す塩基配列の362~696に対応するXreelinのPCR断片を得た。このPCR産物のより上流に位置する配列を得るため、5'RACE (5'-rapid amplification of cDNA end) を実施した。35期アフリカツメガエル全胚から単離した全RNAより、Fast Track 2.0キット (Invitrogen) を用いてPoly(A)+RNA を精製した。後の手順は、Gibco 5'RACEシステムver.2 (GC rich protocol, Gibco BRL) を用いて実施した。第1鎖の合成は、遺伝子特異的プライマー (5'-ATGTCCTCACTGGAAAGATC-3' (配列番号7)) を用いてプライミングした。第2鎖合成反応の精製産物にAテールを付し、AUAPプライマー (Gibco BRL) および遺伝子特異的プライマー (5'-CAGCAACACATAGGGGACAA-3' (配列番号8)) を用いてPCRを実施した。また、3'RACEシステム (Gibco BRL) を用いて3'-RACE (3'-rapid amplification of cDNA end) を実施した。オリゴヌクレオチド (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACG AATTCTATCTATAGC(T)₁₇-3' (配列番号9)) を用いて、Super Script II によって、35期アフリカツメガエル全胚の全RNAより第1鎖cDNAを生成した。その配列が (T)₁₇を除いた上記のオリゴヌクレオチドに相補的であるアダプタープライマー、および遺伝子特異的プライマー (5'-CAGTGTGTTGCTTCCCCACGTGAGTCATCTTCCCA-3' (配列番号10)) を用いてPCRを実施した。このPCR産物を、上記アダプタープライマーおよびネステド (nested) 遺伝子特異的プライマー (5'-CGACAGGTACAGG

ATGTGTCAACTTCATGGCCACA-3' (配列番号11))を用いてさらに増幅した。この工程から单一バンドが得られ、これをpGEM-T Easyベクター(Promega)にクローン化した。このクローンの配列決定をすることによって、選択的スプライシングによって生成されたトランケート型アイソフォームを同定した。cDNAライブラリーのスクリーニングによって、完全型に特異的な配列が解明された。Fast Track 2.0キットを用いて56期アフリカツメガエル・オタマジャクシより調製したPoly(A)+RNAを、オリゴ(dT)₁₂₋₁₈およびランダムヘキサマーと共に第1鎖の合成に使用した。合成したcDNAをλ ZapIIファージベクター(Stratagene)に連結した。図1に示す塩基配列のヌクレオチド414～1253に対応する³²P標識化プローブを用いて、1×10⁶個の独立したクローンをスクリーニングした。その結果2個のクローンを単離し、配列を決定した。これらのクローンの配列決定によって、完全型のヌクレオチド配列(1294～1869)が明らかになった。図1に示すヌクレオチド配列は少なくとも3回の独立したPCR反応によって確認された。

【0020】

結果

リーリンのアフリカツメガエルにおける対応物を得るため、マウスreelinの種々の領域に対する数対の縮重PCRプライマーを設計した。これらのプライマーのうち、F-spondinドメインとCR-50エピトープ領域の間の境界を囲むプライマー対は、マウス/ヒトreelinに高度に相同な配列を有する断片を増幅した。次に、156塩基対(bp)の5'末端非コード領域および1873 bpのコード領域が単離されるように、5'RACEを行い、cDNAライブラリーをスクリーニングした(図1A)。これらの配列は、3つの独立したPCR産物を配列決定することによって確認された。下等脊椎動物とマウス/ヒトのReelinのアミノ酸配列の比較(D'Arcangelo, G., Miao, G.G., Shu-Cheng, C., Soares, H.D., Morgan, J.I. & Curran, T. (1995) Nature 374, 719-723.; DeSilva, U., D'Arcangelo, G., Braden, V., Chen, J., Miao, G., Curran, T. & Green, E.D. (1997) Genome Res. 7, 157-164.)は、進化において保存された領域を明らかにした。Xreelinの推定されるアミノ酸配列は、配列決定した領域の全般にわたってマウス/ヒトreelinとの間で保存されているが、特にF-spondinドメインにおいて保存されている。F-spondinドメイ

ン内の同一性および類似性は、それぞれ93.2% および95.1% と推定される。他方、CR-50 エピトープ領域を含み、F-spondinドメインとReelin repeatsの間に位置するヒンジ領域においては、同一性および類似性はそれぞれ77.2% および84.6% である（図2A、2B）。これらの結果は、F-spondinドメインが機能的に重要であることを強く示唆している。我々はF-spondinドメインのすぐ下流を認識するCR-50 がin vitroおよびin vivoの両方においてReelin機能をブロックすることを以前に報告しているので(Ogawa, M., Miyata, T., Nakajima, K., Yagyu, K., Seike, M., Ikenaka, K., Yamamoto, H. & Mikoshiba, K. (1995) *Neuron* 14, 899-912.; Del Rio, J.A., Heimrich, B., Borrell, V., Forster, E., Drakew, A., Alcantara, S., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., Derer, P., Frotscher, M. & Soriano, E. (1997) *Nature* 385, 70-74.; Miyata, T., Nakajima, K., Mikoshiba, K. & Ogawa, M. (1997) *J. Neurosci.* 17, 3599-3609.; Nakajima, K., Mikoshiba, K., Miyata, T., Kudo, C. & Ogawa, M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8196-8201.)、この知見は特に興味深い。

【0021】

クローン化した領域の下流の配列情報を得るために、3' RACE法を実施した。その結果、F-spondinドメインおよびCR-50 エピトープ領域のみを含むReelinのトランケート型アイソフォームが同定された（図1B、2B）。興味深く、かつ驚くべきことに、この新規なアイソフォームはReelin repeatsを全くもたない。このトランケート型アイソフォームにおいては、TGGコドンの第2のヌクレオチドからヌクレオチド配列が完全型のヌクレオチド配列と異なっている。TGGコドンがTAAに変わっているのである。この差異は、433位のアミノ酸（トリプトファン）を終止コドン(TAA)に変える。その後には698 bpの非コード領域が続き、そしてポリアデニル化シグナル(AATAAA)がポリアデニル化部位の15 bp上流に現れる。完全型およびトランケート型の間で異なっているヌクレオチドは、マウスreelinのエキソン#11の末端に対応している(Royaux, I., Lambert de Rouvroit, C., D' Arcangelo, G., Demirov, D. & Goffinet, A.M. (1997) *Genomics* 46, 240-250.)。このアイソフォームがいかにして生じるのかはまだ完全に分析されていないが、

最も考えられるのはスプライシングがスキッピングしてイントロン#11 中に読み込まれたという説明である。両方のアイソフォームに対するフォワードプライマーおよびトランケート型アイソフォームのみに特異的なりバーズプライマーを用いたPCR増幅を、ゲノムDNAまたはランダムにプライミングされたcDNAのいずれかを鑄型として実施した。これらのPCRは両方とも同一サイズの増幅産物をもたらした。これはスプライシング機構のスキッピングと両立する。

【0022】

〔実施例2〕 ノーザンプロット分析

方法

50期、56期および60期のアフリカツメガエル・オタマジャクシの頭から調製した5 g のpoly(A)+RNA を各レーンにアプライし、電気泳動を行なった後、Zeta-Probe Blotting Membrane (Bio-Rad)に転写した。完全型およびトランケート型に共通の配列ならびにトランケート型の3'末端非コード領域（それぞれヌクレオチド414～1253および1302～2099に対応する）を用いて、 $[\alpha-^{32}\text{P}]$ UTP および $[\alpha-^{32}\text{P}]$ CTP を用いたin vitro転写によって ^{32}P 標識化RNAプローブを合成した。5xSSPE/50%ホルムアミド、5xデンハート溶液および0.5% SDSを含む緩衝液中で、60°Cで一晩ハイブリダイゼーションを実施した。2xSSCおよび0.1% SDSを含む緩衝液を用いて60°Cでフィルターを30分間洗浄し、次に0.1xSSC および0.1% SDSを含む緩衝液を用いて60°Cで30分間洗浄した。

【0023】

結果

この新規なアイソフォームの存在を確認するため、ノーザンプロット分析を実施した（図3）。両方の形態に共通する配列に対するRNAプローブを用いて、12～13キロ塩基(kb)の転写産物を検出した。この結果は、アフリカツメガエルには実際、マウスにおけるreelinに類似した巨大分子として完全型のreelinが存在することを示している。この転写産物の他に、2.8 kbの別な転写産物もまた見いだされた。さらに、3'末端非コード領域をプローブとして用いると、2.8 kbの短い方の転写産物のみが検出された。トランケート型は、1299塩基のコード領域および698塩基の3'末端非翻訳領域を有し、またこれまでに5'末端非翻訳領域の156塩

基がクローン化され配列決定されている。したがって、トランケート型のmRNAは少なくとも2153塩基のヌクレオチドからなることが予想される。ノーザンプロット分析の結果検出されたバンドのサイズはこれよりも大きいが、この不一致は5'末端非翻訳領域のまだ同定されていない領域のためであると思われる。したがって、我々はトランケート型のmRNAは確かに存在すると結論する。

【0024】

〔実施例3〕 RT-PCRによる、Xreelin mRNAを発現する時期の決定
方法

2細胞期および7、8、10/11、12.5、13、15、19、22、28、35/36、42および50期の全胚、ならびに成体脳から全RNAを調製した。1gの全RNAを用いて逆転写を実施し、逆転写産物の1/40を³²P-dCTPを用いたPCRにかけた。PCRプライマーは完全型Xreelinとトランケート型Xreelinとの共通領域内で設計した(5'-TCCCACAAACCTAAGTT-3' (配列番号12) および5'-ATGTCCTCACTGGAAAGATC-3' (配列番号13))。対照として、同一の鑄型を用いてヒストンH4のPCRも実施した(5'-CGGGATAACATTCAAGGTATCACT-3' (配列番号14) および5'-ATCCATGGCGGTAACTGTCTCCT-3' (配列番号15))。PCRのサイクル数はXreelinについては24、ヒストンH4については19であった。

【0025】

結果

転写レベルにおけるXreelin発現の経時変化をRT-PCRによって測定した(図4A)。このアッセイに用いたプライマー対は、完全型とトランケート型の間の共通な配列を增幅するように設計された。各サンプルを標準化するため、ヒストンH4用のプライマー対を用いたPCRを実施した。発生の初期においてはXreelin mRNAは検出されず、このmRNAは後期神経胚(28期)において初めて現われた。オタマジャクシの段階では、そのシグナルは神経胚におけるシグナルよりもはるかに強くなった。Xreelin転写産物は成体の脳にも検出された。マウスの発生においては、reelin mRNAはE8後にin situハイブリダイゼーションによってE8以降検出可能となり、成体脳において発現され続ける(Ikeda, Y. & Terashima, T. (1997) Dev. Dyn. 210, 157-172.; Schiffmann, S.N., Bernier, B. & Goffinet, A.M

(1997) European Journal of Neuroscience 9, 1055-1071.; Alcantara, S., Ruiz, M., D' Arcangelo, G., Ezan, F., de Lecea, L. & Curran, T. (1998) J. Neurosci. 18, 7779-7799.)。アフリカツメガエルの発生における後期神経胚は神経胚形成とCNS の形態発生の間の変換点なので、この段階は神経発生におけるマウス胚のE8に相当する。したがって、Xreelin発現の経時変化はマウスreelinのそれに類似している。

【0026】

〔実施例4〕完全型及びトランケート型のmRNAの定量
方法

完全型及びトランケート型のXreelinの転写産物の量を、遺伝子特異的プライマーおよび5'末端にFAM (5-carboxyfluorescein)を、そして3'末端にTAMRA (N,N',N'-tetramethyl-5-carboxyrhodamine)を結合させたオリゴヌクレオチドプローブ(TaqManプローブ)を用いて、ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer)によって評価した。種々の段階 (2細胞期、22期、28期および43期の全胚) および50~54期脳の種々の部分から全RNAを調製した(図5C)。Super Script II (Gibco BRL) およびランダムヘキサマーを用いて、これらのRNAサンプルの1 gから逆転写(RT)を実施し、逆転写産物の1/40をTaqManプローブを用いたPCRにかけた。このPCR分析の方法はTaqMan PCR Reagent Kit (Perkin Elmer) のプロトコールに従った。1つの逆転写産物について3つの独立したPCR反応を実施することによって、各点で平均および標準偏差を求めた。完全型Xreelinを検出するため、1対のプライマー (5'-GTCCTGATCTACAAACACCTGCTACT-3' (配列番号16) および5'-AGGTA GCACATGGACAAAATCC-3' (配列番号17)) およびTaqManプローブ (5'-(FAM)CTGA AGCAAACCAGTCACCGTGGTCA(TAMRA)-3' (配列番号18)) を用いた。トランケート型Xreelinについては、1対のプライマー (5'-TAGTGAGTGTGACAATCAGAAAGTGA-3' (配列番号19) および5'-GGCCCTTCTGGATAAGAATC-3' (配列番号20)) およびTaqManプローブ (5'-(FAM)TCAACCATTGCTCATACAGATGCACA(TAMRA)-3' (配列番号21)) を用いた。完全型Xreelinまたはトランケート型Xreelinに特異的な配列を含むプラスミドDNAの連続希釈物から作製した標準曲線によってコピー数を推定した。

【0027】

結果

次に、我々は完全型Xreelinと比較したトランケート型Xreelinの発生プロファイルを検討した。この問題を取り組むため、完全型およびトランケート型のmRNAの量をいくつかの時点で測定した（図4B）。蛍光染料FAMおよびTAMRAによって5'末端および3'末端を標識したプローブを用いるTaqMan PCR法によってRNAの量を定量し、PCRの間におけるプローブの分解を観察した。トランケート型Xreelinの発現は28期のあたりで初めて観察され、後の段階ではこのシグナルははるかに強くなった。この発現パターンは完全型Xreelinの発現パターンに類似しており、また完全型Xreelinに対するトランケート型Xreelinの量の比率は発生の全期間を通して5～10%に一定していた。これらの結果は、両形態の絶対量は互いに異なるが、発生における両形態の発現プロファイルは全く同じに調節されていることを示している。

【0028】

〔実施例5〕 *in situ*ハイブリダイゼーション法によるXreelin mRNAの局在化の分析

方法

SDSに基づく *in situ* ハイブリダイゼーションプロトコール (Shain, D.H. & Zuber, M.X. (1996) *J. Biochem. Biophys. Methods* 31, 185-188.) を用いた。35/36期の全胚をMEMFA緩衝液 (Harland, R.M. in *Methods in Cell Biology* (1991) (Academic Press Inc., San Diego), pp685-694.) 中で90分間固定した。47期の脳をMEMFA中で摘出し、新鮮なMEMFA中で90分間固定した。図1Aの414～1252に対応するヌクレオチド配列を含むプラスミドDNAを鋳型として用いて、*in vitro* 転写によってジゴキシゲニン標識化RNAプローブを合成した。Purple AP (ペーリンガー・マンハイム) を用いて、室温で数時間アルカリ性ホスファターゼ発色反応を実施した。70% PBS に溶解した4%パラホルムアルデヒド中で51期の脳を摘出し、新鮮な同一固定液中で一晩固定した。OCT化合物 (Tissue Tech) に包埋した標本を厚さ20 μ m の薄片とし、全胚についても脳についても同じ方法で *in situ* ハイブリダイゼーションに使用した。ただし、発色反応の工程では、全胚については

アルカリ性ホスファターゼ緩衝液に溶解したNBT溶液を、脳については同一緩衝液に溶解したBCIP溶液を使用した。完全型Xreelinおよびトランケート型Xreelinに対するRNAプローブを、図1Aの1296～1825および図1Bの1302～2099に対応する配列からそれぞれ合成した。XdIIおよびエオメソデルミン(eomesodermin)に対するRNAプローブは、51期のアフリカツメガエル・オタマジャクシから調製したcDNAから各遺伝子特異的プライマー(XdIIについては5'-CCTCCAAGTCTGCCTTATG-3' (配列番号22) および5'-GCGGACAACAATATGCAAGG-3' (配列番号23)、エオメソデルミンについては5'-GCGGACAACAATATGCAAGG-3' (配列番号24) および5'-GTTGTTGACAACTGGTCC-3' (配列番号25))を用いて得たPCR断片を含むプラスミドより調製した。

【0029】

結果

Reelin分子はマウス脳の発生におけるきちんと整列した層構造の形成に必要とされる。アフリカツメガエルにもリーリンの対応物が存在するが、アフリカツメガエルの終脳は明白な層構造を全く示さない。したがって、Xreelinがマウス新皮質の相同物であるアフリカツメガエル背側外套(dorsal pallium)で発現されるかどうかは重要である(Northcutt, G.R. & Kaas, J.H. (1995) Trends Neurosci 18, 373-379.; Fernandez, A.S., Pieau, C., Reperant, J., Boncinelli, E. & Wassef, M. (1998) Development 125, 2099-2111.)。この点を調べるため、終脳におけるXreelin mRNAの分布をより厳密に検討した。XdIIはdistallessのアフリカツメガエル対応物であり(Asano, M., Emori, Y., Saigo, K. & Shiokawa, K. (1992) J. Biol. Chem. 267, 5044-5047.)、線条において発現されることが知られている(Asano, M., Emori, Y., Saigo, K. & Shiokawa, K. (1992) J. Biol. Chem. 267, 5044-5047.)。XdII mRNAは終脳の腹側に局在しており(図5D)、そしてXreelin転写産物はXdII陽性領域よりも背側(外側外套 lateral pallium)に見いだされる(図5C)。外側外套の背側に位置する背側外套においては、終脳胞の表面に近い少数の分散した細胞でXreelinが弱く発現される。これらの細胞はマウス新皮質中のカハル-レチウス(Cajal-Retzius)細胞に対応し、そして神経芽細胞の多層アライメント以外の形態形成現象において何らかの機能を有し

ている可能性がある。

【0030】

発生中のマウス嗅球においては、reelin転写産物は僧帽状細胞で発現される。我々はアフリカツメガエル嗅球におけるXreelin発現細胞を同定した。エオメソデルミン(Eomd)は嗅球の僧帽状細胞で特異的に発現されることが知られている(Ryan, K., Garrett, N., Mitchell, A. & Gurdon, J.B. (1996) *Cell* 87, 989-1000.; Ryan, K., Butler, K., Bellefroid, E. & Gurdon, J.B. (1998) *Mech. Dev.* v. 75, 167-170.)。Eomdに対するプローブを用いて、我々は僧帽状細胞が51期嗅球の水平切断面上に"V"字型のパターンに配置されていること(図5F)、およびXreelin転写産物が同じパターンで検出されること(図5E)を明らかにした。その結果、我々はXreelinは発生中の嗅球の僧帽状細胞で発現されると結論した。

【0031】

脳のホールマウントin situハイブリダイゼーションは、Xreelinが蓋で発現されることを明らかにした(図5B)。Xreelin発現細胞の局在化を詳細に解明するため、Xreelin特異的プローブを用いて54期の蓋の横断面とハイブリダイズさせた。Xreelinは、蓋の最も表層に位置する視神経線維層の下に見いだされた(図5B)。視神経線維層を通ってきた網膜軸索は、その下に位置する多細胞層中に入り、特定の板(lamina)サブセットの所で終わる。マウスreelin mRNAの上丘における詳細な分布はこれまで報告されていない。しかし、ホモ接合型リーラーマウスは細胞構築それ自体は正常であるが、網膜蓋投射の異常を示す(Frost, D.O., Edwards, M.A., Sachs, G.M. & Caviness, V.J. (1986) *Brain Res* 393, 109-20.)。総合的に考えると、これらのデータは、Xreelinは発生中の網膜蓋投射において何らかの役割を有することを示唆している。

【0032】

脊髄においては、Xreelinシグナルは最も背側と最も腹側の間にある正中面に對してやや背側に位置する、中間から中間外側部分に主として見いだされる。弱いシグナルは後角にも検出される(図5H)。これらの発現パターンはマウスの発現パターンに類似している(Ikeda, Y. & Terashima, T. (1997) *Dev. Dyn.* 210

, 157-172.; Schiffmann, S.N., Bernier, B. & Goffinet, A.M. (1997) European Journal of Neuroscience 9, 1055-1071.; Alcantara, S., Ruiz, M., D'Arcangelo, G., Ezan, F., de Lecea, L. & Curran, T. (1998) J. Neurosci. 18, 7779-7799.)。

【0033】

トランケート型Xreelinの局在化を調べるために、トランケート型特異的プローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを実施した。我々は完全型Xreelin (図6A) に類似したパターンの微かなシグナルを小脳で検出することができた (図6B)。他の領域においては *in situ* シグナルを検出することはできなかった。そこで、我々はアフリカツメガエル脳の種々の領域由来のRNAを用いて、TaqMan PCR分析を実施した (図6C, 6D)。完全型のmRNAが嗅球、蓋および小脳に大量に見いだされ、これは *in situ* ハイブリダイゼーションによって明らかとなった発現パターンに一致した。他方、トランケート型Xreelinは完全型Xreelinに類似した分布を示し、完全型Xreelinに対するトランケート型の比率はどの領域においても約10%であった。種々の段階から得た結果 (図4B) を考慮すると、両方の形態の発現プロフィールは何らかの共通した機構によって調節されているように思われる。

【0034】

[実施例6] マウスにおけるトランケート型リーリンタンパク質の存在
操作手順

マウスのトランケート型リーリンタンパク質は、3'-RACEによって、その存在が確認された。胎生18日目のリーラー系統のヘテロ胎児 (遺伝子型はPCRにより特定した) から脊髄を取り出し、ここから total RNAを抽出した。5'-GGCCACGCGT CGACTAGTACGAATTCTATCTATAGC(T)₁₇-3' (配列番号9) のプライマーを用いて First strand synthesisを行い、これを Adaptor primer AP2 (5'-CGCGTCGACTAGTACGA ATT-3' (配列番号26)) とリーリン遺伝子特異的プライマーRL-11 (5'-CTGATT GGATTCAAGCTGGAG-3' (配列番号27)) でPCR、さらにこのPCR産物をAP2とリーリン遺伝子特異的プライマーRL-12 (5'-ATTCAGCCCCACAGAGAAGTC-3' (配列番号28)) で nested PCRを行った。

【0035】

結果

このPCRで3本のバンドを確認し、それぞれpGEM-T Easyベクターに組み込み、Sequenceを行ったところ、その内の一つが、マウスリーリンのexon14までを含むが、その後、未知の配列が続く選択的スプライシング産物であった。この選択的スプライシング産物と完全長リーリンタンパク質の違いはexon14の最後のアミノ酸がセリンからアルギニンに置換し、その次のコドンで終止コドンとなることで、そのため、この選択的スプライシング産物はトランケート型であると特定された。このマウスのトランケート型リーリンの3'非翻訳領域の最後には複数のpolyadenylation signal (AATAAA) が確認された。

【0036】

【発明の効果】

本発明のトランケート型リーリンタンパク質およびそれをコードするDNAは、神経細胞の配置異常による滑脳症などの疾患の治療に利用できる。

【0037】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> Truncated form of Reelin protein and DNA encoding the
same

<130> RJH11-060N

<140>

<141>

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2274

<212> DNA

<213> *Xenopus laevis*

<220>

<221> CDS

<222> (157)..(1455)

<220>

<221> sig-peptide

<222> (157)..(234)

<220>

<221> misc-feature

<222> (241)..(726)

<223> F-spondin domain

<220>

<221> misc-feature

<222> (847)..(1197)

<223> CR-50 epitope region

<400> 1

cattctactg tcacgttaac tttccatTTT cttcacttta actttgaaga atttaaaaaa 60

aaccattaat tataatattta tataaatata tatataaan ctctgtatcc caggctgctt 120

atgaagaaag ctcattaaga acagtggac ccagga atg gaa ctg ctc cac acc 174

Met Glu Leu Leu His Thr

1 5

ttc tgc ggt ggg cgc tgg act ttg ctg ctc ttc acg ggg atc ttg tgc 222

Phe Cys Gly Gly Arg Trp Thr Leu Leu Leu Phe Thr Gly Ile Leu Cys

10 15 20

ttt gtt gtt gcc cgc gga gtg ggg tat tat ccc agg ttc tct cca ttc 270

Phe Val Val Ala Arg Gly Val Gly Tyr Tyr Pro Arg Phe Ser Pro Phe

25 30 35

ttt ttc ctt tgc act cat cat gga gaa ctg gaa gga gat ggg gaa caa 318

Phe Phe Leu Cys Thr His His Gly Glu Leu Glu Gly Asp Gly Glu Gln

40 45 50

gga gaa gtg ctc atc tct ctg cac ctg gcg ggc aac ccc agc tac tac 366

Gly Glu Val Leu Ile Ser Leu His Leu Ala Gly Asn Pro Ser Tyr Tyr

55 60 65 70

ata cct ggg cag gag tac cat gtg acc ata tcc act agt acc ttc ttt 414

Ile Pro Gly Gln Glu Tyr His Val Thr Ile Ser Thr Ser Thr Phe Phe

75 80 85

gat ggt ctt ctg gtg act gga ctt tac act tct acc agt gtt caa gcg 462

Asp Gly Leu Leu Val Thr Gly Leu Tyr Thr Ser Thr Ser Val Gln Ala

90 95 100

tct cag agc att gga ggc tct aaa gca ttt gga ttt ggt att atg agc 510
 Ser Gln Ser Ile Gly Gly Ser Lys Ala Phe Gly Phe Gly Ile Met Ser
 105 110 115

gac cgt cag ttt ggt acc cag ttt atg tgc agt gtc gtt gct tcc cac 558
 Asp Arg Gln Phe Gly Thr Gln Phe Met Cys Ser Val Val Ala Ser His
 120 125 130

gtg agt cat ctt ccc aca aca aac cta agt ttt gta tgg att gca cca 606
 Val Ser His Leu Pro Thr Thr Asn Leu Ser Phe Val Trp Ile Ala Pro
 135 140 145 150

cca gca ggt aca gga tgt gtc aac ttc atg gcc aca gca aca cat agg 654
 Pro Ala Gly Thr Gly Cys Val Asn Phe Met Ala Thr Ala Thr His Arg
 155 160 165

gga caa gtt att ttc aag gat gcc ctg gca caa caa ctg tgc gaa caa 702
 Gly Gln Val Ile Phe Lys Asp Ala Leu Ala Gln Gln Leu Cys Glu Gln
 170 175 180

gga gct cct act gaa gct ccc ttg cgg cct aat tta gcc gaa att cac 750
 Gly Ala Pro Thr Glu Ala Pro Leu Arg Pro Asn Leu Ala Glu Ile His
 185 190 195

agt gaa agc atc ctt tta cga gat gat ttt gac tca tat aag ctt cag 798
 Ser Glu Ser Ile Leu Leu Arg Asp Asp Phe Asp Ser Tyr Lys Leu Gln
 200 205 210

gaa ttg aat cca aat att tgg ctc cag tgc aga aat tgc gaa gtt ggt 846
 Glu Leu Asn Pro Asn Ile Trp Leu Gln Cys Arg Asn Cys Glu Val Gly
 215 220 225 230

gag cag tgt ggt gca att atg cat ggt ggg gca gtc act ttt tgt gat 894
 Glu Gln Cys Gly Ala Ile Met His Gly Gly Ala Val Thr Phe Cys Asp
 235 240 245

ccg tat gga cca aga gaa ttg ata act gtt caa atg aac aca act acg 942
 Pro Tyr Gly Pro Arg Glu Leu Ile Thr Val Gln Met Asn Thr Thr Thr
 250 255 260

gca tct gtt ttg cag ttt tct att ggg tca gga tcg tgc agg ttc agc 990
 Ala Ser Val Leu Gln Phe Ser Ile Gly Ser Gly Ser Cys Arg Phe Ser
 265 270 275

tat tca gac cct gga att gtg gtg tca tac aca aag aat aat tca tct 1038
 Tyr Ser Asp Pro Gly Ile Val Val Ser Tyr Thr Lys Asn Asn Ser Ser
 280 285 290

agt tgg atg cca ttg gag aga att agt gct cct tcc aat gtt agc acc 1086
 Ser Trp Met Pro Leu Glu Arg Ile Ser Ala Pro Ser Asn Val Ser Thr
 295 300 305 310

atc att cac att att tac cta cct cct gaa gct aaa gga gaa aat gtg 1134
 Ile Ile His Ile Ile Tyr Leu Pro Pro Glu Ala Lys Gly Glu Asn Val
 315 320 325

aaa ttc cgt tgg agg cag gag aac atg cag gca ggt gat gtg tat gaa 1182

Lys Phe Arg Trp Arg Gln Glu Asn Met Gln Ala Gly Asp Val Tyr Glu

330 335 340

gcc tgc tgg gca ctg gat aac att ttg att atc aat gct gct cat aaa 1230

Ala Cys Trp Ala Leu Asp Asn Ile Leu Ile Ile Asn Ala Ala His Lys

345 350 355

gaa gtc gtg tta gaa gac aat cta gat cca atg gac aca gga aac tgg 1278

Glu Val Val Leu Glu Asp Asn Leu Asp Pro Met Asp Thr Gly Asn Trp

360 365 370

ctt ttt ttc cct ggg gct act gta aag cat acc tgt cag tcg gat gga 1326

Leu Phe Phe Pro Gly Ala Thr Val Lys His Thr Cys Gln Ser Asp Gly

375 380 385 390

aac tct ata tat ttt cat ggt aca gaa agc agt gaa tac aac ttt gct 1374

Asn Ser Ile Tyr Phe His Gly Thr Glu Ser Ser Glu Tyr Asn Phe Ala

395 400 405

act acc aga gat gtg gat ctt tcc agt gag gac atc cag gac cag tgg 1422

Thr Thr Arg Asp Val Asp Leu Ser Ser Glu Asp Ile Gln Asp Gln Trp

410 415 420

tct gaa gag ttt gag aat cta cca gct ggg taa attttagatg tagccatgag 1475

Ser Glu Glu Phe Glu Asn Leu Pro Ala Gly

425 430

cattacattt tatcacgtga aaatgcaaga aacagtattt atatacatat tttaaggc 1535

aatacagaac cctataaatg gcaggttagg gctaccatgt aaatatttt aatgttcata 1595

atgtcatagg tggtaagtat ttacatagc agttactgat tgattattat tgtttgtctt 1655

ttacccagtt acagctaaca cacagggcat tttttccaa tggcaacatc catttgccg 1715

ctctgagcag aacatttggtt tcatttatgg catttgaacc tgtgtctatg agagtgcagc 1775

taaaataaac ttcctggcta tgggtttac catacaacac tggtaacctca tgacatatga 1835

aaaatatgac tcacattaaa tcagtaagat cagttcaagt atagtacggt gcattaatct 1895

gccaataaac atttagaatt gtatttata ttttatattt aagattagaa ttgactccat 1955

tctgtacct tgcacatcat ttgtggctag tttatggtc aatagacagc catcatacat 2015

tagtcagagt aaatcgagca ttacaaaact caatgagcca tagtgagtgt gacaatcaga 2075

agtgactgtc aagtaaatca accatttgct catacagatg cacattgaa cagtggattc 2135

ttatccagaa agggccattt ttactatca ctctgggatt taaatgccac ttctaattgg 2195

aacttccagg tcacaaaaat agaatggaca tttaaacatc atggttctca ttacccctaa 2255

taaaactccg gttttttta 2274

<210> 2

<211> 432

<212> PRT

<213> Xenopus laevis

<400> 2

Met Glu Leu Leu His Thr Phe Cys Gly Gly Arg Trp Thr Leu Leu Leu

1 5 10 15

Phe Thr Gly Ile Leu Cys Phe Val Val Ala Arg Gly Val Gly Tyr Tyr

20 25 30

Pro Arg Phe Ser Pro Phe Phe Leu Cys Thr His His Gly Glu Leu

35 40 45

Glu Gly Asp Gly Glu Gln Gly Glu Val Leu Ile Ser Leu His Leu Ala

50 55 60

Gly Asn Pro Ser Tyr Tyr Ile Pro Gly Gln Glu Tyr His Val Thr Ile

65 70 75 80

Ser Thr Ser Thr Phe Phe Asp Gly Leu Leu Val Thr Gly Leu Tyr Thr

85 90 95

Ser Thr Ser Val Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Gly Ser Lys Ala Phe

100 105 110

Gly Phe Gly Ile Met Ser Asp Arg Gln Phe Gly Thr Gln Phe Met Cys

115 120 125

Ser Val Val Ala Ser His Val Ser His Leu Pro Thr Thr Asn Leu Ser

130

135

140

Phe Val Trp Ile Ala Pro Pro Ala Gly Thr Gly Cys Val Asn Phe Met

145

150

155

160

Ala Thr Ala Thr His Arg Gly Gln Val Ile Phe Lys Asp Ala Leu Ala

165

170

175

Gln Gln Leu Cys Glu Gln Gly Ala Pro Thr Glu Ala Pro Leu Arg Pro

180

185

190

Asn Leu Ala Glu Ile His Ser Glu Ser Ile Leu Leu Arg Asp Asp Phe

195

200

205

Asp Ser Tyr Lys Leu Gln Glu Leu Asn Pro Asn Ile Trp Leu Gln Cys

210

215

220

Arg Asn Cys Glu Val Gly Glu Gln Cys Gly Ala Ile Met His Gly Gly

225

230

235

240

Ala Val Thr Phe Cys Asp Pro Tyr Gly Pro Arg Glu Leu Ile Thr Val

245

250

255

Gln Met Asn Thr Thr Ala Ser Val Leu Gln Phe Ser Ile Gly Ser

260

265

270

Gly Ser Cys Arg Phe Ser Tyr Ser Asp Pro Gly Ile Val Val Ser Tyr

275

280

285

Thr Lys Asn Asn Ser Ser Trp Met Pro Leu Glu Arg Ile Ser Ala

290 295 300

Pro Ser Asn Val Ser Thr Ile Ile His Ile Ile Tyr Leu Pro Pro Glu

305 310 315 320

Ala Lys Gly Glu Asn Val Lys Phe Arg Trp Arg Gln Glu Asn Met Gln

325 330 335

Ala Gly Asp Val Tyr Glu Ala Cys Trp Ala Leu Asp Asn Ile Leu Ile

340 345 350

Ile Asn Ala Ala His Lys Glu Val Val Leu Glu Asp Asn Leu Asp Pro

355 360 365

Met Asp Thr Gly Asn Trp Leu Phe Phe Pro Gly Ala Thr Val Lys His

370 375 380

Thr Cys Gln Ser Asp Gly Asn Ser Ile Tyr Phe His Gly Thr Glu Ser

385 390 395 400

Ser Glu Tyr Asn Phe Ala Thr Thr Arg Asp Val Asp Leu Ser Ser Glu

405 410 415

Asp Ile Gln Asp Gln Trp Ser Glu Glu Phe Glu Asn Leu Pro Ala Gly

420 425 430

<211> 2745

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

<222> (283)..(2052)

<220>

<221> sig-peptide

<222> (283)..(363)

<220>

<221> misc-feature

<222> (284)..(849)

<223> F-spondin domain

<220>

<221> misc-feature

<222> (970)..(1320)

<223> CR-50 epitope region

<400> 3

ggggcgtcgc gtgcacacccg gcggcggcgg cgctcggagg cggacgacgc gctctcggcg 60

cccgcgcccc cggttcccc cgcgcctctcg ctccggcggc ccaaagtaac ttcgggagcc 120

tcggtctccc gctaacttcc ccccgcgccc tcggttgccc ggacccgctc ggctcgagcc 180

cgccgcggc tcgcctccc cgcacgcggc tcctccgtgc cggtgctcc gaaagtggat 240

gagagagcgc gcggggcgcg cggcggcacg gagcgcggcg gc atg gag cgc ggc 294

Met Glu Arg Gly

1

tgc tgg gcg ccg cgg gct ctc gtc ctg gcc gtg ctg ctg ctg ctg gcg 342

Cys Trp Ala Pro Arg Ala Leu Val Ala Val Leu Leu Leu Leu Ala

5

10

15

20

acg ctg agg gcg cgc gcg gcc acc ggc tac tac ccg cgc ttc tcg cct 390

Thr Leu Arg Ala Arg Ala Ala Thr Gly Tyr Tyr Pro Arg Phe Ser Pro

25

30

35

ttc ttt ttc ctg tgc acc cac cac ggg gag ctg gaa ggg gat ggg gag 438

Phe Phe Phe Leu Cys Thr His His Gly Glu Leu Glu Gly Asp Gly Glu

40

45

50

cag ggc gag gtg ctc att tcc ctg cac att gcg ggc aac ccc acc tac 486

Gln Gly Glu Val Leu Ile Ser Leu His Ile Ala Gly Asn Pro Thr Tyr

55

60

65

tac gta ccg gga cag gaa tac cat gtt aca att tca aca agc acc ttc 534

Tyr Val Pro Gly Gln Glu Tyr His Val Thr Ile Ser Thr Ser Thr Phe

70

75

80

ttt gat ggc ttg ctg gtg acg gga ctc tat acc tcg aca agc atc cag 582

Phe Asp Gly Leu Leu Val Thr Gly Leu Tyr Thr Ser Thr Ser Ile Gln

85

90

95

100

tct tct cag agc att gga ggc tcc agc gcc ttt gga ttc ggg atc atg 630
 Ser Ser Gln Ser Ile Gly Gly Ser Ser Ala Phe Gly Phe Gly Ile Met

105 110 115

tcc gac cac cag ttt ggt aac cag ttt atg tgc agt gtg gtg gcc tct 678
 Ser Asp His Gln Phe Gly Asn Gln Phe Met Cys Ser Val Val Ala Ser

120 125 130

cat gtg agt cac ctg cct aca acc aac ctc agc ttt gtc tgg att gcc 726
 His Val Ser His Leu Pro Thr Thr Asn Leu Ser Phe Val Trp Ile Ala

135 140 145

cca cca gct ggc aca ggc tgt gtg aat ttc atg gct act gca aca cat 774
 Pro Pro Ala Gly Thr Gly Cys Val Asn Phe Met Ala Thr Ala Thr His

150 155 160

agg ggc cag gtg att ttc aaa gac gca ctg gcc cag cag ctg tgt gaa 822
 Arg Gly Gln Val Ile Phe Lys Asp Ala Leu Ala Gln Gln Leu Cys Glu
 165 170 175 180

caa gga gct ccc aca gag gcc act gct tac tcg cac ctt gct gaa ata 870
 Gln Gly Ala Pro Thr Glu Ala Thr Ala Tyr Ser His Leu Ala Glu Ile
 185 190 195

cac agt gac agt gtg atc cta cga gat gac ttt gac tcc tac cag caa 918
 His Ser Asp Ser Val Ile Leu Arg Asp Asp Phe Asp Ser Tyr Gln Gln
 200 205 210

ctg gaa ttg aac ccc aac ata tgg gtt gaa tgc agc aac tgt gag atg 966

Leu Glu Leu Asn Pro Asn Ile Trp Val Glu Cys Ser Asn Cys Glu Met

215

220

225

gga gag cag tgt ggc acc atc atg cat ggc aat gct gtc acc ttc tgt 1014

Gly Glu Gln Cys Gly Thr Ile Met His Gly Asn Ala Val Thr Phe Cys

230

235

240

gag ccg tac ggc cct cga gag ctg acc acc aca tgc ctg aac aca aca 1062

Glu Pro Tyr Gly Pro Arg Glu Leu Thr Thr Cys Leu Asn Thr Thr

245

250

255

260

aca gca tct gtc ctc cag ttt tcc att ggg tca gga tca tgt cga ttt 1110

Thr Ala Ser Val Leu Gln Phe Ser Ile Gly Ser Gly Ser Cys Arg Phe

265

270

275

agt tac tct gac ccc agc atc act gtg tca tac gcc aag aac aat acc 1158

Ser Tyr Ser Asp Pro Ser Ile Thr Val Ser Tyr Ala Lys Asn Asn Thr

280

285

290

gct gat tgg att cag ctg gag aaa att aga gcc cct tcc aat gtg agc 1206

Ala Asp Trp Ile Gln Leu Glu Lys Ile Arg Ala Pro Ser Asn Val Ser

295

300

305

aca gtc atc cac atc ctg tac ctc ccc gag gaa gcc aaa ggg gag agc 1254

Thr Val Ile His Ile Leu Tyr Leu Pro Glu Glu Ala Lys Gly Glu Ser

310

315

320

gtg cag ttc cag tgg aaa cag gac agc ctg cga gtg ggt gag gtg tat 1302

Val Gln Phe Gln Trp Lys Gln Asp Ser Leu Arg Val Gly Glu Val Tyr

325 330 335 340

gag gcc tgc tgg gcc ctg gat aac atc ctg gtc atc aat tca gcc cac 1350

Glu Ala Cys Trp Ala Leu Asp Asn Ile Leu Val Ile Asn Ser Ala His

345 350 355

aga gaa gtc gtt ctg gag gac aac ctc gac ccg gtc gac acg ggc aac 1398

Arg Glu Val Val Leu Glu Asp Asn Leu Asp Pro Val Asp Thr Gly Asn

360 365 370

tgg ctc ttc ttc cct gga gca acg gtc aag cat agc tgt cag tca gat 1446

Trp Leu Phe Phe Pro Gly Ala Thr Val Lys His Ser Cys Gln Ser Asp

375 380 385

ggg aac tcc att tat ttc cat gga aat gaa ggc agc gag ttc aat ttt 1494

Gly Asn Ser Ile Tyr Phe His Gly Asn Glu Gly Ser Glu Phe Asn Phe

390 395 400

gcc acc acc cgg gat gta gat ctt tct aca gag gat att caa gag cag 1542

Ala Thr Thr Arg Asp Val Asp Leu Ser Thr Glu Asp Ile Gln Glu Gln

405 410 415 420

tgg tca gaa gaa ttt gag agc cag ccc aca gga tgg gat atc ttg gga 1590

Trp Ser Glu Glu Phe Glu Ser Gln Pro Thr Gly Trp Asp Ile Leu Gly

425 430 435

gca gta gtt ggt gca gac tgt gga acc gta gaa tca gga cta tca ctg 1638

Ala Val Val Gly Ala Asp Cys Gly Thr Val Glu Ser Gly Leu Ser Leu

440

445

450

gtg ttc ctc aaa gat gga gag agg aag ctt tgc acc ccc tac atg gat 1686
 Val Phe Leu Lys Asp Gly Glu Arg Lys Leu Cys Thr Pro Tyr Met Asp

455

460

465

aca act ggt tat ggc aac ctg agg ttc tac ttc gtt atg gga gga atc 1734
 Thr Thr Gly Tyr Gly Asn Leu Arg Phe Tyr Phe Val Met Gly Gly Ile

470

475

480

tgt gac cct gga gtc tct cat gaa aac gat atc atc tta tat gca aag 1782
 Cys Asp Pro Gly Val Ser His Glu Asn Asp Ile Ile Leu Tyr Ala Lys

485

490

495

500

att gaa gga aga aaa gaa cac att gca ctg gac act ctt acc tat tct 1830
 Ile Glu Gly Arg Lys Glu His Ile Ala Leu Asp Thr Leu Thr Tyr Ser

505

510

515

tcc tat aag gtt ccg tct ttg gtt tct gtg gtc atc aac cct gaa ctt 1878
 Ser Tyr Lys Val Pro Ser Leu Val Ser Val Val Ile Asn Pro Glu Leu

520

525

530

cag aca cct gcc acc aaa ttt tgt ctc agg caa aag agc cac caa ggg 1926
 Gln Thr Pro Ala Thr Lys Phe Cys Leu Arg Gln Lys Ser His Gln Gly

535

540

545

tat aat cgg aat gtc tgg gct gtg gac ttc ttc cat gtg ctg ccc gtt 1974
 Tyr Asn Arg Asn Val Trp Ala Val Asp Phe Phe His Val Leu Pro Val

550

555

560

ctc cct tca aca atg tct cac atg atc cag ttt tct att aat ttg gga 2022

Leu Pro Ser Thr Met Ser His Met Ile Gln Phe Ser Ile Asn Leu Gly

565 570 575 580

tgc ggc aca cac cag cct ggg aac agg tga gaagcatgcc gagtgtccta 2072

Cys Gly Thr His Gln Pro Gly Asn Arg

585 590

acatggtagg aaataaacac atgcactgga ccattgaagt aagtttgtca gtaggatttt 2132

tggatggat ttaacaaaa tatccattaa gaaaatacag attcctactc cctccctaaa 2192

agagttcttt ggttaataaa tagaagggat gtgactgggt agattttag gttagaatag 2252

tttcattcag ggagcttcat acaagttatc agaggtgtc accatgtgt gtggcagcat 2312

cccccggtct aacagattgc tgggtgaaga tgactgaaga caagattggc ttctgttggc 2372

tggtacccctt ttataatagg tatggaagtc aattagcact tcaagggcta tgacttctct 2432

gctcctcttgc cataagtgtt gctccatcc tctgtaaaga actttgctga cctcacattc 2492

acaggatgaa gtgacagtgt gagacatggt aattgcctag ctatctatca aattcaagag 2552

cacaaaccca gtttactgtg tattgtcctt cagacgtgc ttttatggca gtaatccat 2612

ggcttgcctt ctgaaggctg gtcaggcttc agtgagagat gacacattt gtaaaggct 2672

tagagaaaatc ccacattcat cgactcattc aaggtattta gctagaaaata aaaagaatca 2732

aaaaaataaa tta 2745

<210> 4

<211> 589

<212> PRT

<213> **Mus musculus**

<400> 4

Met Glu Arg Gly Cys Trp Ala Pro Arg Ala Leu Val Leu Ala Val Leu

1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Thr Leu Arg Ala Arg Ala Ala Thr Gly Tyr Tyr Pro

20 25 30

Arg Phe Ser Pro Phe Phe Leu Cys Thr His His Gly Glu Leu Glu

35 40 45

Gly Asp Gly Glu Gln Gly Glu Val Leu Ile Ser Leu His Ile Ala Gly

50 55 60

Asn Pro Thr Tyr Tyr Val Pro Gly Gln Glu Tyr His Val Thr Ile Ser

65 70 75 80

Thr Ser Thr Phe Phe Asp Gly Leu Leu Val Thr Gly Leu Tyr Thr Ser

85 90 95

Thr Ser Ile Gln Ser Ser Gln Ser Ile Gly Gly Ser Ser Ala Phe Gly

100 105 110

Phe Gly Ile Met Ser Asp His Gln Phe Gly Asn Gln Phe Met Cys Ser

115 120 125

Val Val Ala Ser His Val Ser His Leu Pro Thr Thr Asn Leu Ser Phe

130 135 140

Val Trp Ile Ala Pro Pro Ala Gly Thr Gly Cys Val Asn Phe Met Ala

145 150 155 160

Thr Ala Thr His Arg Gly Gln Val Ile Phe Lys Asp Ala Leu Ala Gln

165 170 175

Gln Leu Cys Glu Gln Gly Ala Pro Thr Glu Ala Thr Ala Tyr Ser His

180 185 190

Leu Ala Glu Ile His Ser Asp Ser Val Ile Leu Arg Asp Asp Phe Asp

195 200 205

Ser Tyr Gln Gln Leu Glu Leu Asn Pro Asn Ile Trp Val Glu Cys Ser

210 215 220

Asn Cys Glu Met Gly Glu Gln Cys Gly Thr Ile Met His Gly Asn Ala

225 230 235 240

Val Thr Phe Cys Glu Pro Tyr Gly Pro Arg Glu Leu Thr Thr Cys

245 250 255

Leu Asn Thr Thr Ala Ser Val Leu Gln Phe Ser Ile Gly Ser Gly

260 265 270

Ser Cys Arg Phe Ser Tyr Ser Asp Pro Ser Ile Thr Val Ser Tyr Ala

275 280 285

Lys Asn Asn Thr Ala Asp Trp Ile Gln Leu Glu Lys Ile Arg Ala Pro

290 295 300

Ser Asn Val Ser Thr Val Ile His Ile Leu Tyr Leu Pro Glu Glu Ala

305 310 315 320

Lys Gly Glu Ser Val Gln Phe Gln Trp Lys Gln Asp Ser Leu Arg Val

325 330 335

Gly Glu Val Tyr Glu Ala Cys Trp Ala Leu Asp Asn Ile Leu Val Ile

340 345 350

Asn Ser Ala His Arg Glu Val Val Leu Glu Asp Asn Leu Asp Pro Val

355 360 365

Asp Thr Gly Asn Trp Leu Phe Phe Pro Gly Ala Thr Val Lys His Ser

370 375 380

Cys Gln Ser Asp Gly Asn Ser Ile Tyr Phe His Gly Asn Glu Gly Ser

385 390 395 400

Glu Phe Asn Phe Ala Thr Thr Arg Asp Val Asp Leu Ser Thr Glu Asp

405 410 415

Ile Gln Glu Gln Trp Ser Glu Glu Phe Glu Ser Gln Pro Thr Gly Trp

420 425 430

Asp Ile Leu Gly Ala Val Val Gly Ala Asp Cys Gly Thr Val Glu Ser

435 440 445

Gly Leu Ser Leu Val Phe Leu Lys Asp Gly Glu Arg Lys Leu Cys Thr

450 455 460

Pro Tyr Met Asp Thr Thr Gly Tyr Gly Asn Leu Arg Phe Tyr Phe Val

465 470 475 480

Met Gly Gly Ile Cys Asp Pro Gly Val Ser His Glu Asn Asp Ile Ile

485 490 495

Leu Tyr Ala Lys Ile Glu Gly Arg Lys Glu His Ile Ala Leu Asp Thr

500 505 510

Leu Thr Tyr Ser Ser Tyr Lys Val Pro Ser Leu Val Ser Val Val Ile

515 520 525

Asn Pro Glu Leu Gln Thr Pro Ala Thr Lys Phe Cys Leu Arg Gln Lys

530 535 540

Ser His Gln Gly Tyr Asn Arg Asn Val Trp Ala Val Asp Phe Phe His

545 550 555 560

Val Leu Pro Val Leu Pro Ser Thr Met Ser His Met Ile Gln Phe Ser

565

570

575

Ile Asn Leu Gly Cys Gly Thr His Gln Pro Gly Asn Arg

580

585

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<220>

<221> modified-base

<222> (8)

<223> i

<400> 5

arttyggnaa ycarttyatg tg

22

<210> 6

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 6

tgytccccat ycartt

16

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 7

atgtcctcac tggaaagatc

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 8

cagcaacaca taggggacaa

20

<210> 9

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 9

ggccacgcgt cgactagtagtac gaattcatct atagctttt ttttttttt t 51

<210> 10

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 10

cagtgtcggtt gcttcccacg tgagtcatct tccca 35

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 11

cgacaggtac aggatgtgtc aacttcatgg ccaca

35

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 12

tcccacacaaca aacctaagtt

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 13

atgtcctcac tgaaaaatc

20

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 14

cggataaca ttcagggtat cact

24

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 15

atccatggcg gtaactgtct tcct

24

<210> 16

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 16

gtcctgatct acaaacacct gctact

26

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 17

agtttagcaca tggacaaaat cc

22

<210> 18

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 18

ctgaagcaaa ccagtcaccg tggta

26

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 19

tagtgagtgt gacaatcaga agtga

25

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 20

ggccctttct ggataagaat c

21

<210> 21

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 21

tcaaccattt gctcatacag atgcaca

27

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 22

cctccaaatgc tgcctttatg

20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 23

gcggacaaca atatgcaagg

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 24

gcggacaaca atatgcaagg

20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 25

ggttgttgac aaactggtcc

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 26

cgcgtcgact agtacgaatt

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 27

ctgattggat tcagctggag

20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 28

attcagccca cagagaagtc

20

【0038】

【配列表フリーテキスト】

配列番号5～17、19、20、および22～28は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号18および21は、プローブの塩基配列を示す。

【図面の簡単な説明】

【図1】

アフリカツメガエルリーリンタンパク質 (Xreelin) の完全型のタンパク質 (A) およびトランケート型アイソフォーム (B) のヌクレオチド配列およびアフリカツメガエルリーリンタンパク質の推定アミノ酸配列を示す。*は停止コドンを表す。矢じり (▼) で示した領域内のアミノ酸は、完全型のリーリンタンパク質には含まれるが、トランケート型アイソフォームには含まれない。ポリアデニル化部位から15ヌクレオチド上流のポリアデニル化シグナルに下線を引いた。

【図2】

Aは、アフリカツメガエル (Xenopus)、マウス (mouse) およびヒト (human) リーリンタンパク質の推定アミノ酸のマルチプルアラインメントを示す。Signalaseソフトで予想された推定シグナルペプチドに破線を引いた。F-spondinドメインには太線を引いた。3種すべての間でアミノ酸残基が共通な領域は枠で囲った。挿入したギャップは-で示した。Xreelinと同一のアミノ酸残基は・で示した。

Bは、マウスリーリンタンパク質、Xreelinおよびトランケート型Xreelinの模式図を示す。定義されていない領域は破線で示す。枠で囲った領域はコード領域

で、線は非コード領域である。

【図3】

Aは、Xreelinのノーザンプロット解析の結果を示す。太い矢印(←)は完全型のリーリンタンパク質を示し、矢じり(◀)はトランケート型のリーリンタンパク質を示す。

(◀)

はトランケート型のリーリンタンパク質を示す。

Bは、Xreelinのウェスタンプロット解析の結果を示す。太い矢印(←)は、リーリンタンパク質抗体142で検出された、マウスリーリンタンパク質と同じサイズのXreelinタンパク質を示す。細い矢印(←)は、メタロプロテイナーゼでプロセシングされた、マウスリーリンタンパク質フラグメントよりわずかに小さいサイズのXreelinタンパク質フラグメントを示す。矢じり(◀)はトランケート型のリーリンタンパク質と予想されるサイズのタンパク質を示す。

(◀)

はトランケート型のリーリンタンパク質と予想されるサイズのタンパク質を示す。

【図4】

種々の発生段階のRNAサンプルを用いて、RT-PCRを行った結果を示す。各レンジのサンプルの発生段階の番号をパネルの一番上に示す。

【図5】

完全型Xreelin mRNAの分布を *in situ* ハイブリダイゼーションで調べた結果を示す(図5 A、B、C、D、E、F)。終脳における線条の領域および嗅球における僧帽状細胞を明確にするため、XdII (D)およびエオメソデルミン(F)に対するアンチセンスプローブもまた使用した。実験に用いたサンプルは、(A) 35/36期の全胚；(B) 47期の全脳；(E、F) 51期の嗅球の水平切断切片；ならびに(C、D)終脳、(G)蓋および(H)脊髄のレベルで切断した54期の冠状切片であった。
 a:アンチセンスプローブ、cp: 小脳原基、ob: 嗅球、s:センスプローブ、tec:蓋。
 縮尺線: A, B 500 μ m; C, D, G, H 100 μ m; E, F 200 μ m。

【図6】

完全型Xreelin mRNAとトランケート型Xreelin mRNAの発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーション (A~C) および TaqMan PCR分析 (D) によって比較した結果を示す。51期小脳の水平切断切片中に、完全型Xreelin mRNA (A) およびトランケート型Xreelin mRNA (B) が検出された。近隣の切片を完全型Xreelinのセンスプローブとハイブリダイズさせた (C)。縮尺線: 100 μ m。アフリカツメガエル脳 (E) の 7 つの部分由来の全RNAを TaqMan PCR分析にかけた。白抜きの棒および黒く塗った棒は、完全型Xreelin mRNAおよびトランケート型Xreelin mRNAのコピー数をそれぞれ示す。

【書類名】 図面

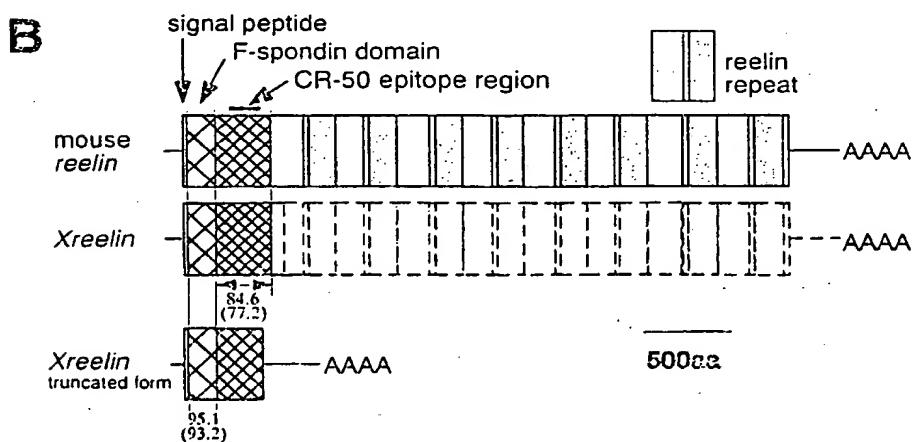
〔圖 1 〕

B GGGTAAATTTAGATGTAGCCATGAGC 432
 1321 ATTACATTTTACGCTGAAATGCGAAGAAAAGTATTATATACATTTAAAGGTCAATACAGAACCTTAAATGGCAGGTTAGGGTACCCATGAAATTTTTAATGTCATAA
 1441 TGTCTAGGTGGATGAACTTTACATGCGACTTGTGGTATTATGTTGTTCTTACCGGTTACAGETACACACGGCCCTTTTTCCATGGCAGGAACTCATTGTCGGC
 1561 AAATATGACTCACATTAAATCTGACCTTGGCTTCTGATGAGCTGAGCTGAACTTAAACCTTCTGGCTTACATCACACCTGGCTTACCATGATGAA
 1681 CTTGTACCTTGGTACCATCTTGGCTTGTGGTACATGAGCTTGGCTTACATGAGCACCATTCAGGTTATGGGTTACATCACACCTGGCTTACCATGATGAA
 1801 CTTGTACCTTGGTACCATCTTGGCTTGTGGTACATGAGCACCATTCAGGTTATGGGTTACATCACACCTGGCTTACCATGATGAA
 1921 GGTGACTCTGGTACAGTAACTTCAAACTTGGCTTGTGGTACATGAGCACCATTCAGGTTATGGGTTACATCACACCTGGCTTACCATGATGAA
 2041 ATTCGAGCTCAAAATATAAGTGGACATTTAACATCATGGTCTCATTGCTTCACTTGGCTTACATCACACCTGGCTTACCATGATGAA

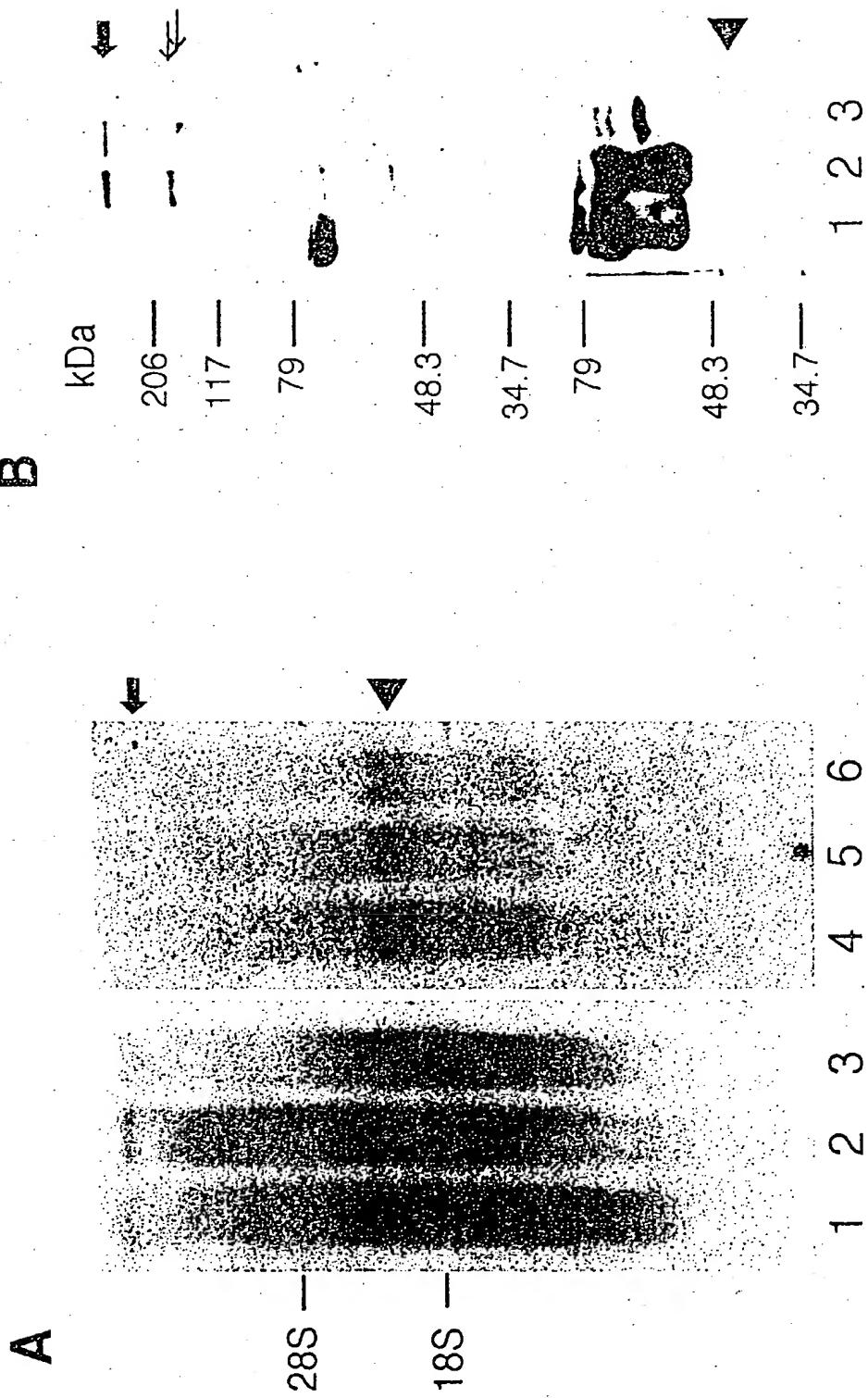
〔図2〕

A

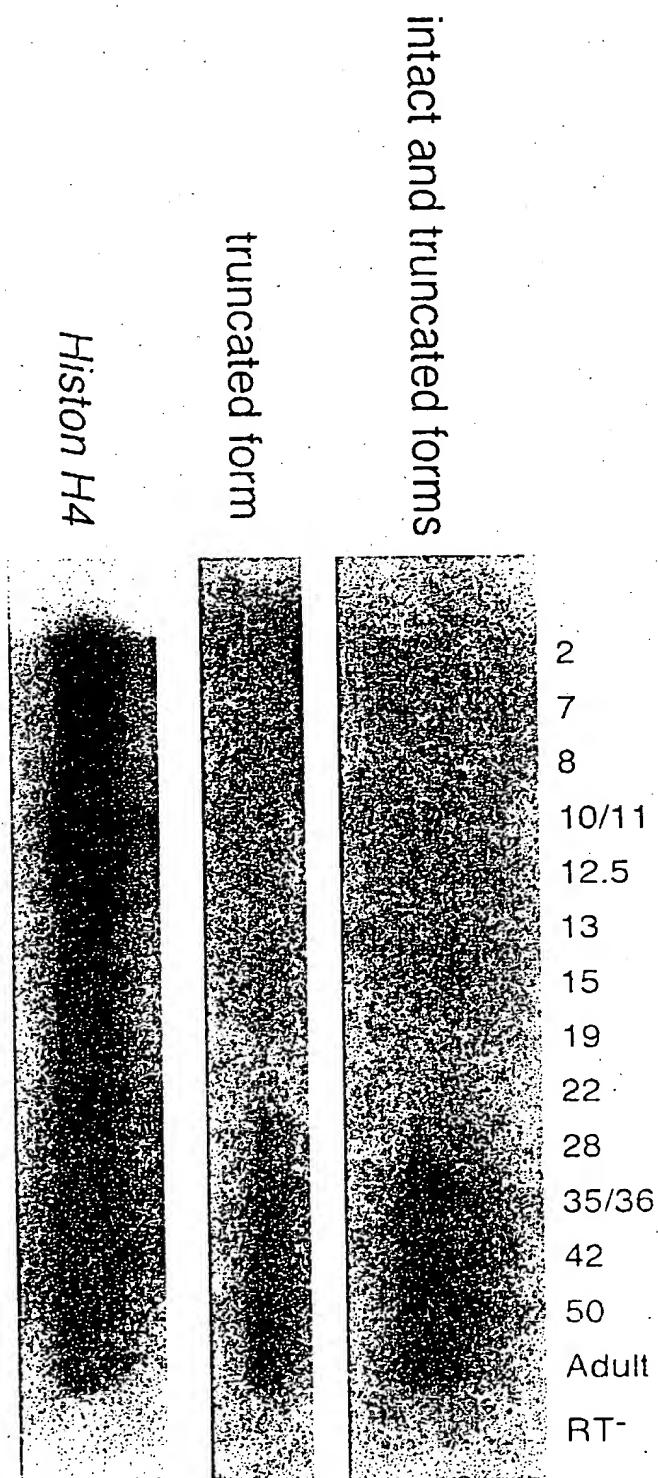
Xenopus	1:ME-LHHTFCGGRWTL	LLFTGILCFVW	ARGV	YYPPRFSPFFL	CTHHGELEGDGEQGEVLI	59			
mouse	1:RGCWARALVLAV	LLAT	-RAF	-AT		58			
human	1:RSGWARQTFLLA	LLGAT	-RAF	-AA		57			
Xenopus	60:SLHLAGNPASYYDPGQEYHVTISTSTFFDGLVTGLYTSTS	QASQSIQGS	AFGFGIMSD		119				
mouse	59:.....H.....M.....T.....S.....			118				
human	58:.....T.....				117				
Xenopus	120:RJFGTQFMCVVASHVSHLPITNLSPWIAIAPPAGTGCVNFMATATHRGQVIFRKDALAQQL					179			
mouse	119:R.....N.....				178			
human	118:R.....H.....				177			
Xenopus	180:LEQGAPTEAPLRPNLAETHSE	SILL	ROODFDST	KLQEENPNINW	LQRNCMGEQCGA	MHG	239		
mouse	179:.....TAYSH.....	DVI	QQL	VELS	238		
human	178:.....DVTVH.H.....	DLI	IHQLO	VELN	237		
Xenopus	240:GRVTFDPPYGPRLI	IVQM	TTTASVLQFSIGSGSCRF	SYSDPGE	MSMTKNNSSSP	MPO	299		
mouse	239:N.....E.....	TCL	S.....A.....	TAD	298		
human	238:N.....E.....	TGL	S.....A.....	AD	297		
Xenopus	300:ERISAPSNSVSTI	HHI	TPPEAKGEN	MKPARAR	JENMQAD	DYEA	359		
mouse	299:K.R.....M.....L.....E.....	S.....Q.....K	DSL	RM.E.....	M.S.R	358		
human	298:K.R.....M.....L.....E.....	S.....Q.....K	DSL	RM.E.....	S.RQ	357		
Xenopus	360:NVLEDVLDPMOTGNMLFPFGATVRHIC	QSDGN	SIYFHG	YSEYRFAI	TRDVULS	SED	419		
mouse	359:.....M.....S.....	NIC	F	418		
human	358:.....S.....M.....	NIC	F	417		
Xenopus	420:DQWSEEFLNAGIEIVGAVI	TECGTIESGSP	UVFLRDGERR	WCTPYHDTT	GYGNLRFY		479		
mouse	419:E.....SQT	D.L.....VAD		478		
human	418:E.....SQT	DVL		477		
Xenopus	480:IMGGMSPGESHENDV	ILYAK	TDGRKEHII	MOTLAYSSYKV	TSLVSAV	ISED	539		
mouse	479:M.....I.D.M.....T	K.E.....	AL	T	P	M.N.E	538		
human	478:M.....I.D.M.....T	K.E.....	AL	T	P	M.N.E	537		
Xenopus	540:FCUKOTSPRC	QNL	NVWA	DPV	AVLPVLPSTIES	SMWQFSINLGCG	HFQPGNSVS	CEFSTNM	599
mouse	539:.....R.K.D.M.R.....F	M.I		598	
human	538:.....R.K.N.D.I.R.....F	M.I		597	
Xenopus	600:GRWSWLLHSECLPBLCAQSHLPHS								
mouse	599:.....M.....I.....H.....								
human	598:.....M.....I.....H.....								



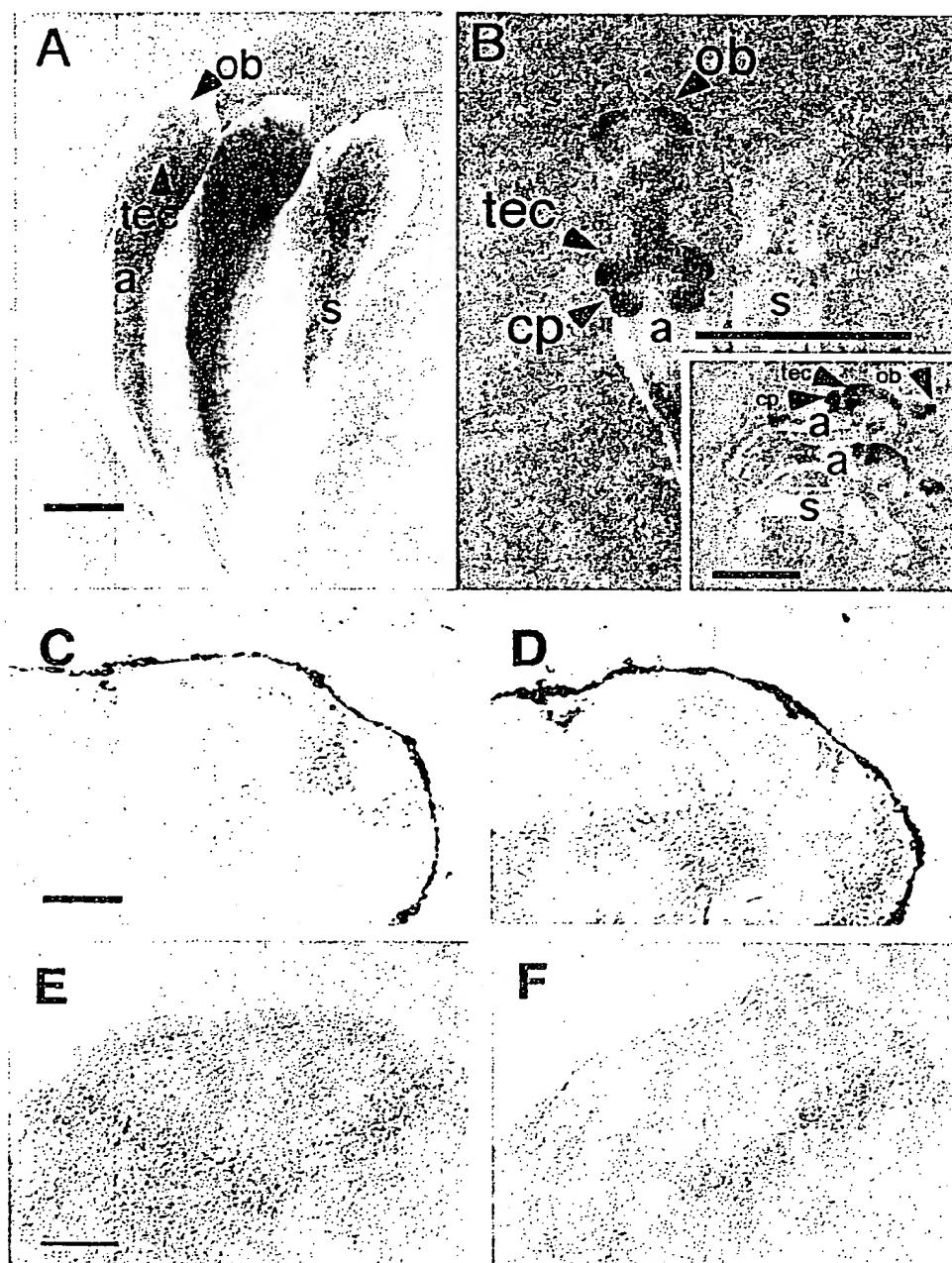
【図3】



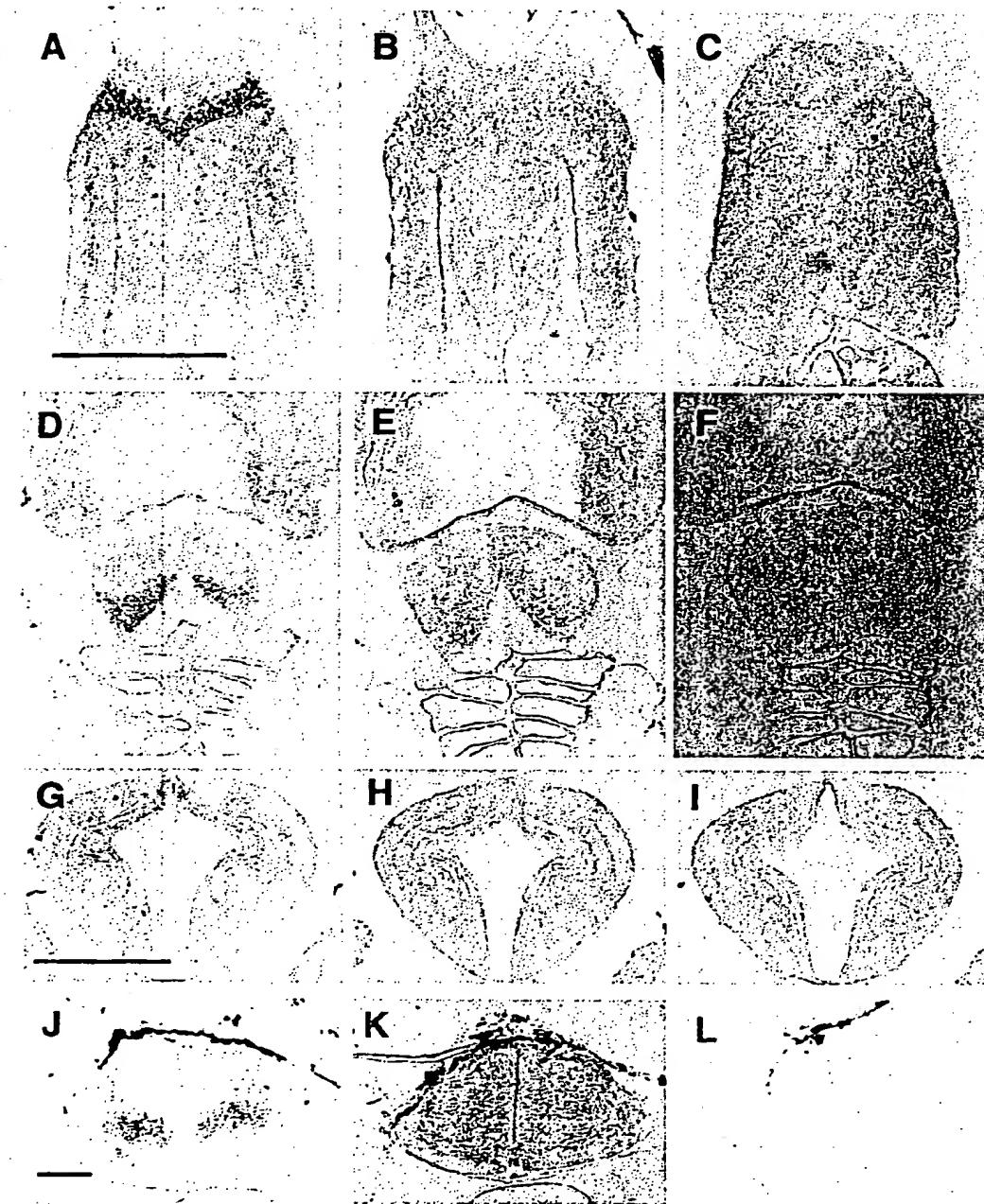
【図4】



【図5】



【図6】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 リーリンタンパク質のF-spondinドメインおよびCR-50認識部位を含むが、リピート部位を含まないトランケート型リーリンタンパク質およびそれをコードするDNA。

【効果】 本発明のトランケート型リーリンタンパク質およびそれをコードするDNAは、神経細胞の配置異常による滑脳症などの疾患の治療に利用できる。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書
【整理番号】 RJH11-060N
【提出日】 平成12年 6月29日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2000-109954
【補正をする者】
【識別番号】 392017978
【氏名又は名称】 御子柴 克彦
【代理人】
【識別番号】 100091096
【弁理士】
【氏名又は名称】 平木 祐輔
【手続補正 1】
【補正対象書類名】 特許願
【補正対象項目名】 委任状
【補正方法】 追加
【補正の内容】
【提出物件の目録】
【物件名】 委任状 1

(A)10001220047



委 任 状

平成12年6月22日

100091096
 私は、識別番号100096183弁理士平木祐輔
 100098121石井貞次 氏を以って
 代理人として下記事項を委任します。

記

1. 特 許 出 願



に関する一切の件並びに本件に関する放棄若しくは取下げ、出願変更、拒絶査定
 不服及び補正却下の決定に対する審判の請求並びに取下げ。

2. 上記出願又は 平成 年 月 日 号

に基づく「特許法第41条第1項及び実用新案法第8条第1項の」優先権主張並び
 にその取下げ。

3. 上記出願の分割出願及び補正却下の決定に対する新たな出願に関する一切の件並び
 に本件に関する上記事項一切。
4. 上記出願に関する審査請求、優先審査に関する事情説明書の提出、刊行物の提出、
 実用新案技術評価の請求、証明の請求及び上記出願又は審判請求に関する物件の
 下附を受けること。
5. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立て又は商標（防護商標）登録に対する
 登録異議の申立てに関する手続。
6. 第1項に関する通常実施権許諾の裁判請求、裁判取消請求並びにそれ等に対する
 答弁、取下其他本件に関する提出書類及び物件の下附を受けること。
7. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続を為すこと。
8. 上記事項を処理する為、復代理人を選任及び解任すること。

住 所 東京都三鷹市井の頭 2-19-25

氏 名 御子柴 克彦



認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-109954
受付番号	10001220047
書類名	手続補正書
担当官	仲村 百合子 1730
作成日	平成12年 8月 8日

＜認定情報・付加情報＞

【提出された物件の記事】

【提出物件名】 委任状（代理権を証明する書面） 1

次頁無

出願人履歴情報

識別番号 [000006792]

1. 変更年月日 1990年 8月28日
[変更理由] 新規登録
住 所 埼玉県和光市広沢2番1号
氏 名 理化学研究所

出願人履歴情報

識別番号 [392017978]

1. 変更年月日 1992年 5月29日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都三鷹市井の頭2-19-25

氏 名 御子柴 克彦